

(19)



(11)

EP 2 671 950 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

11.12.2013 Patentblatt 2013/50

(51) Int Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **12170995.0**

(22) Anmeldetag: **06.06.2012**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**

Benannte Erstreckungsstaaten:

BA ME

(71) Anmelder: **PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG**

35037 Marburg (DE)

(72) Erfinder:

- **Hempel, Franziska**
61169 Friedberg (DE)
- **Maier, Uwe**
35039 Marburg (DE)

(74) Vertreter: **Stumpf, Peter**

c/o TransMIT GmbH
Kerkraeder Strasse 3
35394 Gießen (DE)

(54) **Expression und Sekretion von rekombinanten, vollständig assemblierten Proteinkomplexen durch Mikroalgen**

(57) Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten und funktionellen Proteinkomplex mit medizinischem oder biotechnologischem Nut-

zen in Mikroalgen dar, wobei der Proteinkomplex ein Antikörper, Enzym, Hormon oder Impfstoff ist und dieser ins Medium sezerniert wird.

EP 2 671 950 A1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Expression von medizinisch oder biotechnologisch relevanten Proteinkomplexen in Mikroalgen, wobei die Proteinkomplexe vollständig assembliert und funktionell sind und ins Medium sezerniert werden.

Allgemeines Gebiet und Stand der Technik

[0002] Es ist seit langem bekannt, dass Proteine, die medizinischen oder biotechnologischen Nutzen haben, wie z.B. Antikörper, Enzyme, Hormone und Impfstoffe, rekombinant durch Expressionssysteme in Bakterien, Hefen, tierischen bzw. humanen Zellkulturen hergestellt werden können.

[0003] Die Produktion von Proteinen in solchen bekannten Expressionssystemen ist, besonders wenn diese Proteine in größeren Mengen benötigt werden, mit verschiedenen Nachteilen verbunden.

[0004] Bakterielle Expressionssysteme haben den Nachteil, dass Bakterien keine eukaryoten posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen einfügen, die aber häufig für die Funktionalität des Proteins und gewünschte medizinische oder biotechnologische Anwendung entscheidend sind. An das Kulturmedium werden hohe Qualitätsanforderungen gestellt und es ist relativ teuer. Es besteht zudem die ständige Gefahr von Kontaminationen z.B. mit bakteriellen Toxinen, die steriles Arbeiten unbedingt erforderlich machen. In der Regel werden die exprimierten Proteine in sogenannten inclusion bodies angereichert und müssen in zusätzlichen aufwendigen Schritten isoliert werden.

[0005] Expressionssysteme mit tierischen oder humanen Zellkulturen oder in transgenen Tieren überwinden zwar den Nachteil der mangelnden Glykosylierung und liefern Proteine, die nahezu identisch mit den originalen Proteinen sind, aber die Verfahren sind aufwendig, störanfällig und der Einsatz von transgenen Tieren wird eher kritisch bewertet. In den Zellkulturen werden meist hochqualitative teure Kulturmedien eingesetzt und auch hier besteht die ständige Gefahr von Kontaminationen z.B. mit human-pathogenen Keimen, die steriles Arbeiten erforderlich machen. Der Einsatz von transgenen Tieren ist aus ethisch-moralischen Gründen umstritten, weiterhin können Pathogene, Viren oder Prionen übertragen werden. Eine Alternative stellt die Expression von Proteinen, die medizinischen oder biotechnologischen Nutzen haben, wie z.B. Antikörper, Enzyme, Hormone und Impfstoffe, in höheren Pflanzen dar. Selbst humane Proteine können in Pflanzen z.T. mit guter Funktionalität exprimiert und durch Modifikationen von Glykosylierungsenzymen auch bereits mit humanen Glykosylierungsmustern ausgestattet werden. Ein entscheidender Vorteil von pflanzlichen Expressionssystemen ist, dass die Energie der Sonne durch Photosynthese genutzt wird, keine teuren Kohlenstoffquellen zugegeben werden müssen und die Produktion eine neutrale CO₂ Bilanz aufweist. Die Kultivierung der Pflanzen ist im Freiland daher vergleichsweise günstig.

[0006] Nachteilig ist, dass die exprimierten Proteine erst aufwendig aus den Pflanzen isoliert und aufgereinigt werden müssen. Die Akzeptanz transgener Pflanzen im Freiland ist durch die ungewollte Verbreitung von transgenem Pollen und den damit verbundenen Gefahren bzw. Risiken sowie den Genehmigungsverfahren problematisch. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist, dass Pflanzen, die für biotechnologische Verfahren genutzt werden, auf wertvollen Ackerflächen angebaut werden und somit mit der Nahrungsmittelproduktion konkurrieren.

Aufgabe

[0007] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Expression und Sekretion von funktionellen Proteinkomplexen, die medizinischen oder biotechnologischen Nutzen haben, wie z.B. Antikörper, Enzyme, Hormone und Impfstoffe, bereitzustellen.

Lösung der Aufgabe

[0008] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Ansprüche gelöst. Erfindungsgemäß erfolgt die Expression von Proteinkomplexen, die medizinischen oder biotechnologischen Nutzen haben, wie z.B. Antikörper, Enzyme, Hormone und Impfstoffe, in einem Expressionssystem mit Algen insbesondere mit Mikroalgen und einem entsprechenden erfindungsgemäßen Verfahren, bei dessen Durchführung mindestens ein vollständig assemblierter Proteinkomplex ins umgebende Medium sezerniert wird.

[0009] Dies hat den Vorteil, dass die geschlossene Reaktorproduktion sowie die vergleichsweise einfache Isolation des Proteinkomplexes aus dem Kulturmedium mit der kostengünstigen und CO₂-neutrale Produktion von pflanzlichen/phototrophen Systemen vereint wird.

[0010] Unter Mikroalgen versteht der Fachmann eukaryotische, pflanzenartige Lebewesen, die Photosynthese betreiben, jedoch nicht zu den eigentlichen Pflanzen gehören. Im engeren Sinne werden als Mikroalgen mikroskopisch kleine einzellige bis wenigzellige Lebewesen bezeichnet, z.B. die Kieselalgen oder Diatomeen (Bacillariophyta).

[0011] Diese Kieselalgen sind Hauptbestandteil des Meeresplanktons und stellen einen Großteil der marinen Biomasse

dar. Als Sauerstoff produzierende (oxygen) Phototrophe erzeugen sie auch einen großen Teil des Sauerstoffs in der Erdatmosphäre.

[0012] Die Kultivierung dieser Mikroalgen erfolgt in Reaktoren, die mit Wasser und Nährsalzen sowie gegebenenfalls künstlichem Licht betrieben werden.

[0013] Bevorzugt erfolgt die Kultivierung der Mikroalgen in geschlossenen Photobioreaktoren, wie beispielsweise Röhren-Photoreaktoren, oder FPA-Reaktoren (Flachplatten-Airlift-Reaktoren). Die Reaktoren sind z.B. volldurchmischt, weisen eine geringe Schichtdicke und gezielte Strömungsführung im Reaktor auf. Über eingebaute statische Mischer kann eine verbesserte Licht- und Substratversorgung aller Algenzellen erreicht werden. Im Reaktor liegen die Mikroalgen in einer hohen Konzentration vor, was eine hohe Wirtschaftlichkeit des Produktionsprozesses bedeutet. Das FPA-Reaktorsystem nutzt auch schwächeres Licht optimal aus.

[0014] Wichtig ist bei der Auswahl des Reaktors ein hohes Oberflächen/VolumenVerhältnis, damit die Zelldichten höher sind, als im freien Gewässer gehaltene Kulturen von Mikroalgen.

[0015] Ein besonderer Vorteil des Expressionssystems mit Mikroalgen ist, dass die Produktion durch Photosynthese angetrieben wird und damit besonders kostengünstig ist, da keine teuren Kohlenstoffquellen zugeführt werden müssen. Die Produktion ist zudem CO₂-neutral und bietet im Gegensatz zu Pflanzen den Vorteil, dass viele Mikroalgen ein schnelles Wachstum aufweisen und keine wertvollen Ackerflächen benötigen. Ein weiterer positiver Gesichtspunkt dieses Expressionssystems ist der Sicherheitsaspekt. Die verwendeten Mikroalgen sind frei von Pathogenen wie Prionen oder Viren sowie frei von Endotoxinen. Das geschlossene Fermentersystem schließt eine ungewollte Freisetzung gentechnisch-veränderter Mikroalgen in die Umwelt aus und ermöglicht gleichzeitig eine Produktion unter kontrollierten cGMP Bedingungen (current Good Manufacturing Practice). Erfindungsgemäß können selbst vollständig assemblierte Proteinkomplexe nicht nur in Mikroalgen wie der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* exprimiert sondern auch ins Medium sekretiert werden, wodurch aufwendige Verfahren zu Zellaufschluss und Aufreinigung der Proteinkomplexe entfallen. Dies ist ein entscheidender Unterschied zu bisherigen Untersuchungen zur Expression von rekombinanten Proteinen in Mikroalgen.

[0016] Beispielhaft, aber nicht abschließend wird die Expression und Sekretion von Proteinkomplexen, die medizinischen oder biotechnologischen Nutzen haben, wie z.B. Antikörper, Enzyme, Hormone und Impfstoffe an der Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum*, einer Diatomee, gezeigt.

[0017] Gerade die Expression von Proteinkomplexen, deren korrekte Assemblierung, also das Zusammenfügen aller Proteinuntereinheiten zu einem Proteinkomplex, essentiell ist, ist in bekannten Expressionssystemen aus dem Stand der Technik problematisch, da dort die Proteine häufig nicht funktionell exprimiert werden.

[0018] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist der Proteinkomplex nicht nur vollständig assembliert, sondern er wird von den Mikroalgen auch ins Medium sezerniert. Damit ist eine einfache Isolierung und Gewinnung von Proteinen, die medizinischen oder biotechnologischen Nutzen haben, wie z.B. Antikörper, Enzyme, Hormone und Impfstoffe möglich.

[0019] Beispielhaft aber nicht abschließend wird hier die Synthese und Sekretion eines funktionellen und vollständig assemblierten humanen IgG Antikörpers durch die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* gezeigt.

[0020] Erfindungsgemäß umfasst das Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen folgende Verfahrensschritte, die modular hintereinander geschaltet werden:

- i) Synthese der Gene für den mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex wobei die Codon-Usage der Mikroalge berücksichtigt wird und die Sequenz für ein Signalpeptid ergänzt wird, sofern kein Sekretionssignal vorhanden ist und wobei die Zielsteuerungssequenzen, die in der Mikroalge zu einem intrazellulären Fehltargeting führen und die Sekretion verhindern, eliminiert werden
- ii) Klonierung der Gene für den mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex aus Schritt i) in einen geeigneten Vektor mit mindestens einem induzierbaren Promotorsystem
- iii) Transformation von Mikroalgenzellen mit einem Vektor nach Schritt ii)
- iv) Selektion der Mikroalgenzellen aus Schritt iii) die den Vektor mit den Genen für den mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex aus Schritt ii) enthalten.
- v) Screening der transformierten und selektierten Mikroalgenzellen aus Schritt iv) auf Syntheseeffizienz und Funktionalität des sezernierten mindestens einen Proteinkomplexes
- vi) Wachstum der Mikroalgenzellen aus Schritt v) in einem Reaktor mit Medium

[0021] Anschließend wird das Medium mit dem ins Medium sezernierten mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplexes direkt für medizinische oder biotechnologische Anwendungen eingesetzt und verwendet. Alternativ schließt sich ein weiterer Schritt an:

- vii) Isolieren des mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplexes aus Schritt vi)

aus dem Medium

[0022] Insbesondere sind die Zielsteuerungssequenzen, die in Schritt i) eliminiert werden Sequenzen, die in der Mikroalge zu einem intrazellulären Fehltargeting führen und die Sekretion verhindern, z.B. ER-Retentionssignale, mitochondriale Zielsteuerungssequenzen, plastidäre Zielsteuerungssequenzen, peroxisomale Zielsteuerungssequenzen, lysosomale Zielsteuerungssequenzen oder kernspezifische Zielsteuerungssequenzen.

[0023] Insbesondere erfolgt in

Schritt ii) die Klonierung der Gene in Form von einzelnen Untereinheiten des mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplexes. Ein geeigneter Vektor mit mindestens einem induzierbaren Promotorsystem ist z.B. der Nitratreduktasepromotor/-terminator, wodurch die Proteinexpression durch Zugabe von nitrathaltigem Medium induziert werden kann.

[0024] Beispielhaft erfolgt das Screening der Transformanten auf Syntheseeffizienz und Funktionalität des sezernierten Proteinkomplexes mit einem ELISA oder kommerziellen Easy Titer Test.

[0025] Erfindungsgemäß werden für das Verfahren Mikroalgen, z.B. die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* verwendet. Die Kultivierungsmethoden und das Wachstum der Mikroalgen in einem Reaktor mit geeignetem Medium sind dem Fachmann bekannt.

[0026] In einem Ausführungsbeispiel ist der mindestens eine medizinisch oder biotechnologisch nützliche Proteinkomplex ein Antikörper. In diesem Fall wird das Medium nach Schritt vi), dass den Antikörper enthält, direkt für diagnostische Anwendungen wie ELISA Analysen eingesetzt.

[0027] Die Sekretionsleistung des Antikörpers in das Medium liegt zwischen 500 und 3000 ng/ml je nach Dichte der Kultur und Dauer der Expression. Figur 2 zeigt beispielhaft die Sekretionsleistung bei 2500 ng/ml (Fig. 2).

[0028] Für die Sekretion des Antikörpers sind keine speziellen Modifikationen des *Phaeodactylum tricornutum* Stamms - wie die Reduktion der Zellwand oder ähnliches - notwendig.

Ausführungsbeispiel

[0029] Im vorliegenden Beispiel wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ein humaner Antikörper, z.B. der humane IgG1 Antikörper CL4mAb, der das Oberflächenprotein HBsAg des Hepatitis B Virus erkennt, hergestellt. Der Antikörper wird effizient ins Medium sekretiert und ist vollständig assembliert und biologisch funktionsfähig.

[0030] Dazu wird der humane IgG1 Antikörper CL4mAb, der das Oberflächenprotein HBsAg des Hepatitis B Virus erkennt, zunächst im endoplasmatischen Retikulum der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* exprimiert. Dieser Antikörper stammt ursprünglich aus der humanen Zell-Linie TAPC301-CL4 und wurde bereits zuvor im heterologen System Tabak bzw. als Fab-Fragment auch in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und erfolgreich getestet. Durch Deletion des C-terminalen ER-Retentionssignals, wird eine effiziente Sekretion des Antikörpers ins umgebende Medium der Mikroalgen ermöglicht.

[0031] Die vollständigen Sequenzen für die schwere und leichte Kette (also inklusive Fc-Teil) des Antikörpers IgG1/kappa Antikörper CL4mAb gegen das Hepatitis B Virus Oberflächenprotein werden in *P. tricornutum* eingebracht (Aminosäuresequenz AAB86466.2, AAB86467.2). Die Verfahren entsprechen den üblichen Klonierungsmethoden und sind dem Fachmann bekannt. Die Nukleinsäure-Sequenzen werden zuvor der Codon-Usage von *P. tricornutum* angepasst und von der Firma MrGene (Regensburg) generiert (Genbank: JF970211, JF970210).

[0032] Die C-terminale Sequenz DDEL, das sogenannte ER-Retentionssignal wird entfernt, damit die Proteine in das Medium sezerniert werden können und sich nicht in der Mikroalge anreichern. Die humane Zielsteuerungssequenz am N-Terminus des Antikörpers ist notwendig, um den Proteinkomplex ins Medium zu dirigieren. Dies führt im vorliegenden Ausführungsbeispiel dazu, dass der Antikörper nun effizient mit bis zu 500 bis 3000 ng/ml ins Medium abgegeben wird (Fig. 1 und Fig. 2).

[0033] Für die effiziente Sekretion ist kein spezieller Stamm an Mikroalgen mit reduzierter Zellwand oder ähnlichem notwendig.

[0034] Zur Klonierung wird beispielsweise der Vektor pPha-DUAL[2xNR] verwendet (GenBank: JN180664). Dies ist ein Plasmid, das sich von dem Vektor pPhaT1 (GenBank: AF219942) ableitet. Das Plasmid pPha-DUAL[2xNR] zeichnet sich dadurch aus, dass es eine weitere MCS (Multiple cloning site) besitzt und beide MCSs unter dem induzierbaren Promotor/Terminator der Nitratreduktase von *P. tricornutum* stehen. Figur 3 zeigt die Vektorkarte. Das Expressionssystem kann durch Zugabe von Nitrat induziert werden, so dass eine optimale Expressionszeit ermittelt und diese reguliert werden kann. Die beste Sekretionseffizienz mit 2500 ng/ml wird bei hohen Zelldichten erreicht ($OD_{600nm} \geq 1$) und einer Induktionszeit von etwa 2 Tagen (Fig. 2). Ein Mediumwechsel nach 3 Tagen zeigt, dass dies die Synthese/Sekretionsleistung noch mal bis auf 3000 ng/ml erhöht und auch eine kontinuierliche Kultivierung der Zellen möglich ist - ein wichtiger Faktor für die Umsetzung einer kostengünstigen Kultivierung und Produktion im großem Maßstab (Fig. 2). Grundsätzlich ist auch eine dauerhafte Induktion in NO_3 -Medium möglich, da das Zellwachstum durch die Antikörperproduktion nicht beeinträchtigt wird, allerdings liefert eine Dauerinduktion geringere Ausbeuten mit Höchstwerten von

ca. 550 ng/ml Antikörper im Medium.

[0035] Die Transformation der Mikroalge *P. tricornutum* erfolgt mittels der dem Fachmann bekannten Methode des Partikelbombardements. Dabei werden M10 Wolframpartikel und 1350 psi Rupture disks für die Transfektion mit dem Bio-Rad Biolistic PDS-1000/He verwendet.

[0036] Die Selektion erfolgt mit dem Antibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 75 µg/ml.

[0037] Die Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, University of Texas Culture Collection, strain 64) wird in f/2 Medium unter Standardbedingungen mit entweder 0,9 mM NO₃ oder 1,5 mM NH₄ als Stickstoffquelle kultiviert. Die Zellen werden in 150 ml Ansätzen bei 22°C und konstanter Illumination (80 mmol photons per m² per s) unter Schütteln (150 rpm) angezogen.

[0038] Zur Analyse der Menge an sezerniertem Antikörper werden die Zellen pelletiert (10 min, 1500 x g) und das Medium filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm), um sicherzustellen, dass keine intakten Zellen mehr im Überstand enthalten sind. Zur Bestimmung der Antikörpermenge wird beispielsweise das Easy Titer Kit Easy-Titer human IgG (H+L) Assay Kit (ThermoScientific) verwendet. Die Funktionalitätsanalysen wurden mit einem ELISA-Test (z.B. einem ELISA-Test nach Hempel et al. 2011 a) beschrieben. Abhängig von der Dichte der Kultur variiert die Menge an funktionellem Antikörper im Medium und erreicht 500ng/ml bis 3000 ng/ml.

[0039] Das filtrierte Medium mit dem sezernierten Antikörper wird direkt für die Quantifizierung sowie ELISA Analysen eingesetzt.

[0040] Weitere Aufreinigungsschritte des Proteins sind nicht zwangsläufig notwendig. Figur 1 zeigt in der Coomassie-Färbung eines Proteingels, dass das Medium neben dem sezernierten Antikörper keine weiteren Proteine in größeren Mengen enthält. Das Medium kann zu diagnostischen Zwecken wie ELISA folglich direkt verwendet werden oder aber der Antikörper wird alternativ zuvor z.B. durch ProteinA Sepharose nach Herstellerangaben aufgereinigt.

[0041] Weiterhin werden alternativ Schritte zur Ankonzentrierung des sezernierten Antikörpers oder der Austausch des Mediums gegen einen adäquaten Puffer zur Langzeitlagerung angeschlossen.

Abbildungslegende

[0042]

Fig. 1 zeigt Vektorkarte zu pPhaDUAL [2xNR]. Beide Multiple Cloning Sites (MCS I und MCSII) stehen unter dem Nitratreduktase (NR) Promotor von *P.tricornutum*.

Fig. 2 zeigt die schematische Auswertung von Untersuchungen zu Quantität und Funktion des sezernierten Antikörpers in Relation zum Wachstum der Kultur. Die Expression und Sekretion des Antikörpers wird bei einer optischen Dichte von ca. 0,6 eingeleitet (T0). Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurden Proben des Mediums genommen, filtriert und die Menge sowie die Funktionalität des sezernierten Antikörpers ermittelt (T1, T2, T3). Nach 3 Tagen wird das Medium mit den darin enthaltenen Antikörpern komplett entfernt und durch frisches Nitrat-haltiges Medium ersetzt (T0*) und Proben über 2 weitere Tage entnommen. Abs. - Absorption, AK - Antikörper

Fig. 3 zeigt eine Analyse des sekretierten humanen IgG Antikörpers C14mAb aus *P. tricornutum*. Die Western Blot Analysen zeigen, dass bei einer Expression des Antikörpers mit einem ER-Retensionssignal (+DDEL) nur ein kleiner Teil ins Medium abgegeben wird (M) und der Großteil im Zellpellet verbleibt. Durch Deletion des ER-Retensionssignals (-DDEL) wird der Antikörper effizient ins Medium abgegeben. Eine vergleichende Coomassie-Färbung des Proteingels (links) macht deutlich, dass neben dem sezernierten Antikörper kaum weitere Proteine im Medium vorhanden sind. Für die Western Blot Analysen werden 15 ml Medium einer dichten Kultur filtriert, ankonzentriert, gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt (M). Zur Kontrolle werden 10 µg Gesamtprotein des Zellpellets aufgetragen (P). Für die Coomassie-Färbung werden 30 ml Medium filtriert, ankonzentriert und gefällt.

EP 2 671 950 A1

SEQUENCE LISTING

<110> Philipps-Universität Marburg
 5 <120> Expression und Sekretion von rekombinanten, vollständig
 assemblierten Proteinkomplexen durch Mikroalgen
 <130> TM662
 <140> EP
 10 <141> 2012-06-06
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 15 <210> 1
 <211> 711
 <212> DNA
 <213> human
 20 <220>
 <221> C14mAb light chain gen
 <222> (1)..(711)
 <223> Synthetisches Konstrukt C14mAb light chain gene, cDNA Sequenzen
 der leichten Kette des humanen IgG Antikörpers CL4mAb mit
 25 angepasster Codon-Usage für die Expression in P. tricornutum
 <400> 1
 atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgttgcctc ggctcccagt ttcagatacc 60
 actggagaaa ttgtgatgac gcagtctcca gccaccctct ctgtgtctcc aggggaacgc 120
 30 gccaccctct cctgccgtgc cagtcagagt gtctgcagca acttggcctg gtaccagcag 180
 aaacctggcc aggctccccg cctcctcatc tatgtctgat ccaccgcgc cactggtatt 240
 ccagcccgtt tcaagtggcag tgggtctggg acagagttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 35 caatctgaag atttcgcagt ttattactgt cagcagtata atgaatggtt tcggacgttc 360
 ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgc actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
 40 ttctatcccc gcgaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
 45 cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaaccgtg gagagtgtta g 711
 <210> 2
 <211> 1404
 50 <212> DNA
 <213> human
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1404)
 55 <223> Synthetisches Konstrukt C14mAb heavy chain gene,

EP 2 671 950 A1

cDNA Sequenzen der schweren Kette des humanen IgG Antikörpers
CL4mAb mit angepasster Codon-Usage für die Expression in *P. tricornutum*

5	<400> 2	
	atggagtttg ggctcagctg ggttttcctc gttgctcttt tgcgcggtgt ccagtgtcag	60
	gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggcgctccct gcgcctctcc	120
10	tgtgtagcct ctggattcac cttcagtagc taccctatga cctgggtccg ccaggctcca	180
	ggcaaggggc tggagtgggt ggcaagtatt tcatatgacg gaagttataa atataaggtg	240
	gactccatga agggccgcct caccatctcc cgtgacaatt ccaagaacac gctgtatttg	300
15	gaaatgaaca gcctgacagc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgcg cacagctttc	360
	tttaacgcct atgacttctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc	420
	aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	480
20	gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca	540
	ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tccagtcctc aggactctac	600
25	tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc	660
	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	720
	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	780
30	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccgcacccc tgaggtcaca	840
	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	900
	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgcgagg agcagtacaa cagcacgtac	960
35	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	1020
	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1080
40	gggcagcccc gcgaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag	1140
	aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1200
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1260
45	gtcggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagccgctg gcagcagggg	1320
	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1380
50	ctctccctgt ctccgggtaa atga	1404

Patentansprüche

1. Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen umfassend die Schritte:
 - i) Synthese der Gene für den mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex wobei die Codon-Usage der Mikroalge berücksichtigt wird und die Sequenz für ein Signalpeptid ergänzt wird,

sofern kein Sekretionssignal vorhanden ist und wobei die Zielsteuerungssequenzen, die in der Mikroalge zu einem intrazellulären Fehltargeting führen und die Sekretion verhindern, eliminiert werden

ii) Klonierung der Gene für den mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex aus Schritt i) in einen geeigneten Vektor mit mindestens einem induzierbaren Promotorsystem

iii) Transformation von Mikroalgenzellen mit einem Vektor nach Schritt ii)

iv) Selektion der Mikroalgenzellen aus Schritt iii), die den Vektor mit den Genen für den mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex aus Schritt ii) enthalten

v) Screening der transformierten und selektierten Mikroalgenzellen aus Schritt iv) auf Syntheseeffizienz und Funktionalität des sezernierten mindestens einen Proteinkomplexes

vi) Wachstum der Mikroalgenzellen aus Schritt v) in einem Reaktor mit Medium

2. Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der mindestens eine medizinisch oder biotechnologisch nützliche Proteinkomplex nach Schritt vi) aus dem Medium isoliert wird.

3. Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** der mindestens eine medizinisch oder biotechnologisch nützliche Proteinkomplex ein Antikörper, Enzym, Hormon oder Impfstoff ist.

4. Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** der mindestens eine medizinisch oder biotechnologisch nützliche Proteinkomplex ein humaner IgG Antikörper ist.

5. Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mikroalge eine Diatomee ist.

6. Verfahren zur Expression und Sekretion von mindestens einem vollständig assemblierten Proteinkomplex in Mikroalgenzellen gemäß Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Mikroalge *Phaeodactylum tricornutum* ist.

7. Vollständig assemblierter Proteinkomplex hergestellt mit einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 6 in Mikroalgenzellen.

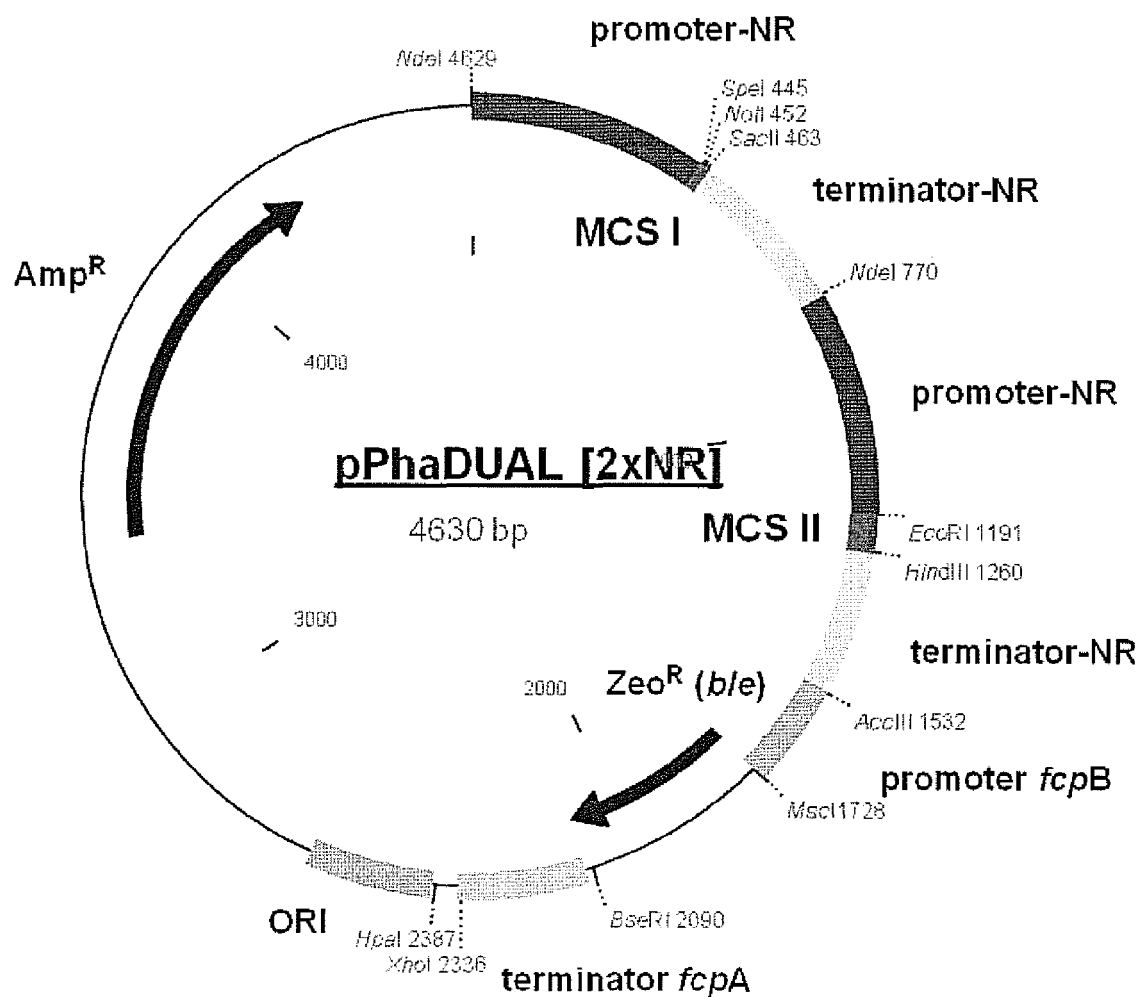
8. Verwendung eines vollständig assemblierten Proteinkomplexes gemäß Anspruch 7 für medizinische oder biotechnologische Anwendungen.

9. Mikroalgenzelle deren Zielsteuerungssequenzen, die zu einem intrazellulären Fehltargeting führen und die Sekretion verhindern, eliminiert wurden umfassend Sequenzen für ein Signalpeptid und einen Vektor nach Schritt ii), mit Genen, die für mindestens einen medizinisch oder biotechnologisch nützlichen Proteinkomplex kodieren.

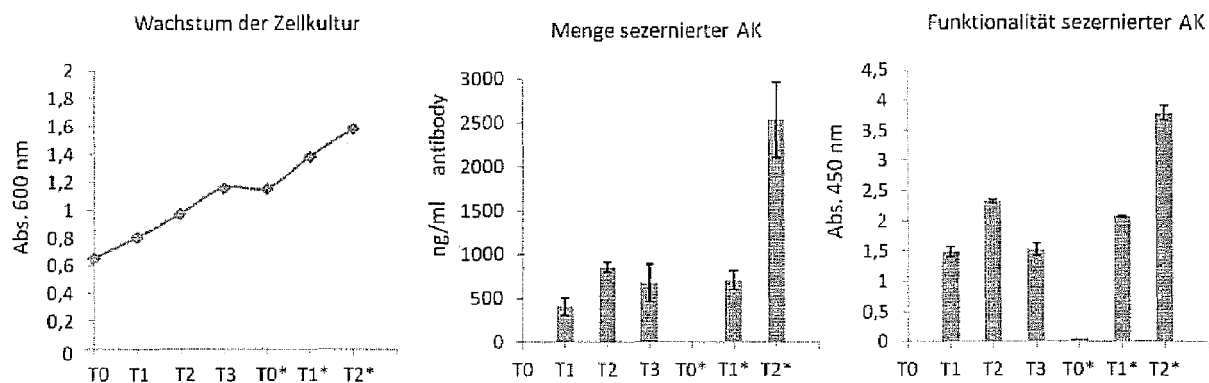
10. Mikroalgenzelle gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass**, der mindestens eine medizinisch oder biotechnologisch nützliche Proteinkomplex ein Antikörper, Enzym, Hormon oder Impfstoff ist.

11. Mikroalgenzelle gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet, dass**, der mindestens eine medizinisch oder biotechnologisch nützliche Proteinkomplex ein humaner IgG Antikörper ist.

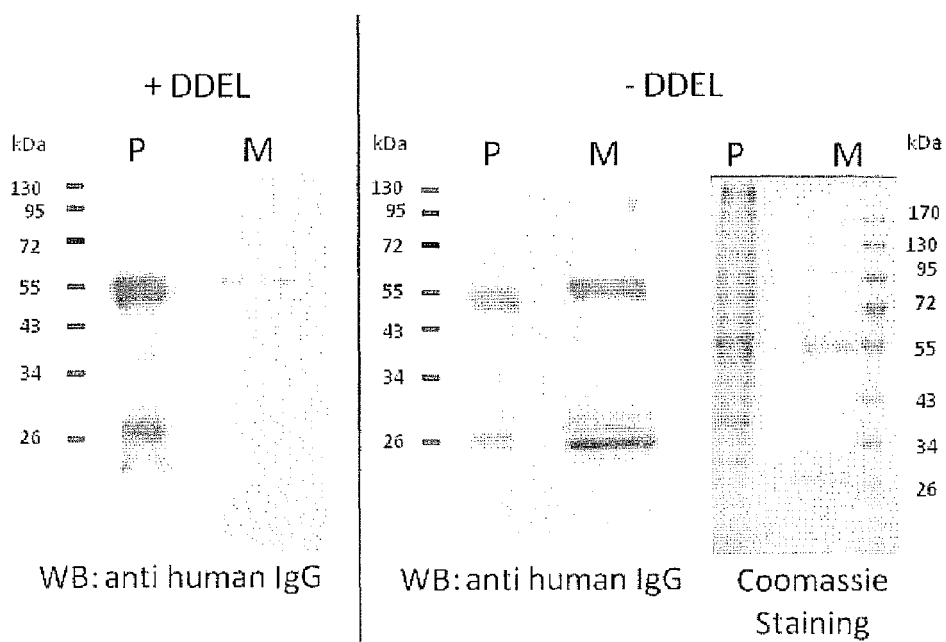
12. Mikroalgenzelle gemäß Anspruch 9 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass**, sie der Gattung *Phaeodactylum tricornutum* angehört.



Figur 1



Figur 2



Figur 3



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung
EP 12 17 0995

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	HEMPEL FRANZISKA ET AL: "Algae as Protein Factories: Expression of a Human Antibody and the Respective Antigen in the Diatom <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ", PLOS ONE, Bd. 6, Nr. 12, Dezember 2011 (2011-12), XP002681385, ISSN: 1932-6203	7,8	INV. C12N15/82
Y	* das ganze Dokument *	1-12	
X	WO 2012/052170 A1 (ALGENICS [FR]; LEJEUNE ALEXANDRE [FR]; MICHEL REMY [FR]; CADORET JEAN-) 26. April 2012 (2012-04-26)	7-10,12	
Y	* Seite 1; Beispiele 3, 4 * * Seite 5 - Seite 7, Absatz 3 * * Seite 12, Zeile 20; Anspruch 1 *	1-12	
X	WO 2011/090708 A2 (MERIAL LTD [US]; GUO XUAN [US]; TROUPE KAROLYN MARIE [US]; FEILMEIER B) 28. Juli 2011 (2011-07-28)	7,8	
A	* Absätze [0036], [0112] - [0117]; Anspruch 19; Beispiel 2 *	1-6,9-12	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
X	GRIESBECK CHRISTOPH ET AL: "Chlamydomonas reinhardtii", MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, Bd. 34, Nr. 2, Sp. Iss. SI, Oktober 2006 (2006-10), Seiten 213-223, XP002681386, ISSN: 1073-6085	7,8	C12N
A	* Tabelle 3 *	1-6,9-12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 17. Oktober 2012	
		Prüfer Krüger, Julia	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

2

EPO FORM 1503 03-82 (P04C03)



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung
EP 12 17 0995

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
A	YANGMIN GONG ET AL: "Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 38, Nr. 12, 1. September 2011 (2011-09-01), Seiten 1879-1890, XP019982203, ISSN: 1476-5535, DOI: 10.1007/S10295-011-1032-6 * das ganze Dokument * * Seite 1881, Spalte 2 * -----	1-12	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
A	SCHOUTEN A ET AL: "THE C-TERMINAL KDEL SEQUENCE INCREASES THE EXPRESSION LEVEL OF A SINGLE-CHAIN ANTIBODY DESIGNED TO BE TARGETED TO BOTH THE CYTOSOL AND THE SECRETORY PATHWAY IN TRANSGENIC TOBACCO", PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, Bd. 30, 1. Januar 1996 (1996-01-01), Seiten 781-793, XP000677225, ISSN: 0167-4412, DOI: 10.1007/BF00019011 * Zusammenfassung * -----	1-12	
A	BAIET BERENGERE ET AL: "N-Glycans of Phaeodactylum tricornutum Diatom and Functional Characterization of Its N-Acetylglucosaminyltransferase I Enzyme", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 286, Nr. 8, Februar 2011 (2011-02), Seiten 6152-6164, XP002681391, ISSN: 0021-9258 ----- -/--	1-12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 17. Oktober 2012	Prüfer Krüger, Julia
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

 2
EPO FORM 1503 03/82 (P04C03)



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung
 EP 12 17 0995

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
T	FRANZISKA HEMPEL ET AL: "An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency", MICROBIAL CELL FACTORIES, Bd. 11, Nr. 1, 1. Januar 2012 (2012-01-01), Seite 126, XP55040968, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-11-126 * das ganze Dokument * -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 17. Oktober 2012	Prüfer Krüger, Julia
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

 2
 EPO FORM 1503 03 82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 12 17 0995

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

17-10-2012

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2012052170 A1	26-04-2012	EP 2444495 A1	25-04-2012
		WO 2012052170 A1	26-04-2012

WO 2011090708 A2	28-07-2011	AR 079767 A1	15-02-2012
		CA 2785653 A1	28-07-2011
		EP 2519258 A2	07-11-2012
		US 2011162115 A1	30-06-2011
		WO 2011090708 A2	28-07-2011

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82